

**Abschlußbericht zum Projekt 0312260:
Identifizierung von Apoptose-modifizierten Proteinen**

Projektleiter: Dr. Thomas Rudel

I.

1. Aufgabenstellung

Apoptose ist ein allen Zellen höherer Organismen innewohnendes Programm sich selbst zu zerstören. Die Forschung der letzten 10 Jahre hat gezeigt, dass Apoptose ein grundlegender Prozess der Entwicklung und Erhaltung mehrzelliger Lebewesen ist. Das besondere Interesse an der Erforschung der Apoptose erklärt sich aber vor allem durch in jüngster Zeit gewonnene Erkenntnisse, dass Apoptose bei zahlreichen Erkrankungen des Menschen eine wichtige Rolle spielt.

Die Übertragung von apoptotischen Signalen erfolgt zu einem großen Teil durch posttranslationale Modifikation von Proteinen. Ein zweiter wesentlicher Mechanismus liegt in der Neuverteilung von Proteinen innerhalb der zellulären Kompartimente. Beides, die Modifikation und die Neuverteilung, bieten die Chance, die an der apoptotischen Signalübertragung beteiligten Faktoren zu identifizieren: Proteine, die während der Apoptose modifiziert werden oder deren Lokalisierung innerhalb der Zelle sich ändert, können über Proteomanalyse identifiziert werden. Das Ziel des Projektes 0312260 war die proteomanalytische Identifizierung und teilweise Isolierung der an der apoptotischen Signalübertragung beteiligten Faktoren. Diese sollten patentiert und in einer eigens zu diesem Zweck zu gründenden Firma verwertet werden.

2. Voraussetzungen

Das BMBF und die MPG förderten das Projekt 0312260 für 2 Jahre mit jeweils 725.000 DM. In eigens für dieses Projekt gemieteten Räumen im Berliner DRK-Klinikum Westend wurde innerhalb des Förderzeitraums eine Forschergruppe mit 2 Wissenschaftlern, 1 Doktorand und 2 technischen Assistenten etabliert. Die für die Durchführung erforderlichen Geräte wurden entweder neu angeschafft oder am MPI für Infektionsbiologie genutzt.

3. Planung und Ablauf des Vorhabens

Das Projekt gliederte sich in zwei Teilprojekte:

1. Erfassung und Identifizierung von Apoptose-induziert modifizierten Proteinen
2. Isolierung der Gene von neuen, Apoptose-modifizierten Proteinen

Innerhalb des **ersten Teilprojektes** sollten im ersten Antragsjahr die während der Apoptose modifizierten Proteine im Gesamtlysat über 2-DE detektiert und massenspektrometrisch identifiziert werden. Im zweiten Antragsjahr war geplant, dieses Vorgehen mit veränderten Proteine aus den Kompartimenten Kern und Mitochondrien zu wiederholen. Von Anfang an sollte eine Datenbank der Faktoren erstellt und fortlaufend ergänzt werden. Des weiteren sah die Planung vor, noch während des laufenden Projektes die Ergebnisse zu patentieren.

Das **zweite Teilprojekt** hatte die Isolierung der Gene der identifizierten Faktoren zum Inhalt. Geplant war die Isolierung von insgesamt 15 Genen (10 mit bekannter und 5 mit unbekannter Gensequenz). Antisera sollten generiert und getestet werden.

Bei erfolgreichem Verlauf des Projektes sollte eine Firma gegründet werden, um die patentierten Ergebnisse selbst zu vermarkten.

4. Wissenschaftlicher und technischer Stand

Zum Beginn des Projektes im Jahre 1999 waren die grundlegenden Prinzipien der apoptotischen Signaltransduktion bekannt. Eine neue Familie von Cysteinylaspartasen (Caspasen), Proteasen, die Proteine nach Aspartat schneiden, waren als die wichtigsten Effektoren der apoptotischen Signaltransduktion erkannt und charakterisiert worden. Erhält eine Zelle ein apoptotisches Signal, aktiviert diese zuerst die Caspasen die daraufhin zelluläre Substrate an wenigen Stellen schneiden. Caspasen haben die Funktion eines Schalters auf das apoptotische Programm. Sie schneiden die Apoptoseregulatoren und aktivieren, inaktivieren, zerstören oder induzieren nur ihre Umverteilung in der Zelle. Als Konsequenz dieser Signalübertragung durch Proteolyse stirbt die Zelle durch Apoptose. Ungefähr 30 Substrate für Caspasen waren bekannt, nur von wenigen kannte man die Funktion für die Apoptose. Um den Prozess der Apoptose und insbesondere die modifizierten Regulatoren als Ganzes zu erfassen sollte eine Proteomanalyse apoptotischer Zellen durchgeführt werden.

Für die Proteomanalyse konnte auf die bewährte 2-DE Großeltechnik nach Klose (Klose and Kobalz, 1995) zurückgegriffen werden. Die Technik wurde zu Beginn des Projektes etabliert und für dessen Anforderungen standardisiert. Protokolle für die

Standardisierung der Apoptoseinduktion waren nicht vorhanden und mussten ebenfalls neu etabliert werden.

5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Zu Beginn des Projektes wurde eng mit der Arbeitsgruppe von Dr. Jungblut am MPI für Infektionsbiologie, Berlin, zusammengearbeitet. Die Techniken der Proteomanalyse mittels der Großgeltechnik wurde in dieser Zeit von der AG Rudel übernommen und projektspezifisch modifiziert. Massenspektrometrische Messungen wurden am MPI für Infektionsbiologie und am Max-Delbrück Zentrum in Berlin durchgeführt.

II.

1. Ergebnisse

Zunächst wurde eine 2DE-Datenbank von Jurkat T-Zellen erstellt (<http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>) (Thiede et al., 2000). Es wurden 95 Markerproteine identifiziert. Diese Proteine dienen zur Kalibrierung der Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte. Die gewonnenen Daten konnten genutzt werden um allgemeine Regeln für übersehene Spaltungen von Trypsin, Oxidation von Tryptophan und Pyroglutamat-Bildung von N-terminalen Glutaminsäuren zu erkennen (Thiede et al., 2000). Diese Regeln wurden in eine Software zur Identifizierung von Proteinen integriert (Parker, J. Am. Soc. Mass. Spectrom., 2002). Durch den Vergleich der 2DE-Muster von nicht-apoptotischen mit apoptotischen Jurkat T-Zellen nach Induktion der Apoptose über den Todesrezeptor Fas (CD95/Apo-1) wurden im Totallysat 20 unterschiedliche Spots von 11 verschiedenen Proteinen identifiziert. Zur weiteren Anreicherung der Proteine und zur Aufklärung von Translokationen wurden anschließend die Kompartimente per differentieller Zentrifugation in die Fraktionen Kern, Mitochondrion, Membranen und Cytosol aufgetrennt. Dabei wurden neben den bereits bekannten Spots aus dem Totallysat zusätzlich 165 Spots von 73 weiteren Proteinen identifiziert (Thiede et al., 2001; Thiede et al., Proteomics, in press).

Insgesamt wurden 104 Apoptose-assoziierte Proteine identifiziert, 78 davon waren bisher nicht in den Zusammenhang mit Apoptose gebracht worden. Auffällig war,

dass 40 % der modifizierten Proteine ein oder mehrere RNA-Bindungsmotive enthalten. Interessanterweise konnten 22 Oncogene bzw. Oncogen-interagierende Proteine identifiziert werden. Aufgrund der großen Fortschritte in der Sequenzierung des humanen Genoms, konnten alle Proteine durch Peptmassenfingerabdruck bei ausreichendem Signal zu Rauschen-Verhältnis der Massenspektren identifiziert werden. Dennoch wurden auch unbekannte Proteine ohne ersichtliche Homologie zu bekannten Proteinen identifiziert. Weiterhin wurde eine Fülle von Informationen über Caspase-Spaltungen und Translokationen erhalten. Die Caspase-Spaltung wurde für 33 Proteine nach *in vitro* Translation überprüft. Dabei wurde die Spaltung mit Caspase-3 für 23 Proteine verifiziert, die restlichen 10 Proteine enthielten keine Spaltstelle. Die Lokalisation der Caspaseschnittstellen wurde durch Mutationsexperimente bestimmt. Zur Vorhersage der putativen Spaltstellen wurden die Daten aus den 2DE-Mustern wie Molekulargewicht und isoelektrischer Punkt sowie der Peptidmassenfingerabdruck genutzt, was zu einer starken Einschränkung der möglichen Schnittstellen führte. Es wurde keine einheitliche Regel für die RNA-Bindungsmotive bzgl. der Caspaseschnittstellen gefunden. Jedoch wurde für zwei Proteine mit RNA-Bindungsmotiv eine Abhängigkeit der Caspase-Spaltung von gebundener RNA bewiesen. Translokationen wurden ohne und mit Caspase-Spaltung beobachtet. In globaler Betrachtung wurde die Translokation von den Kernen und Membranen zu den Mitochondrien und das Cytosol nach Apoptoseinduktion beobachtet.

2. Nutzen und Verwertbarkeit der Ergebnisse

Die Ergebnisse lassen sich sowohl **wissenschaftlich** als auch **wirtschaftlich** verwerten. Einige Daten des Proteomscreens wurden schon während der Laufzeit des Projektes in insgesamt 4 internationalen Publikationen veröffentlicht und damit anderen Wissenschaftlern zugänglich gemacht. Weitere Publikationen, die direkt mit dem Screen in Verbindung stehen, sind zur Zeit nicht geplant. Die Funktion der einzelnen Targets soll nun in der MediTarget GmbH über moderne Methoden der funktionellen Genomanalyse wie die RNA-Interferenz aufgeklärt, deren Einfluss auf Krankheitsprozesse detailliert untersucht werden. Diese so validierten Targets eignen sich für Wirkstoffsuchen aus denen sich in Kooperation mit Partnerfirmen neue Therapien entwickeln lassen.

3. Bekannt gewordener Fortschritt

Zwischenzeitlich publizierten mehrere Gruppen Proteomanalysen apoptotischer Zellen. Brockstedt et al. und Otto et al. (Brockstedt et al., 1999; Otto et al., 1998) untersuchten apoptotische B-Zellen und identifizierten einige Faktoren, die auch im Screen dieses Projektes gefunden wurden. Gut ein Jahr nach Beginn des Projektes wurde ein Proteomeprojekt veröffentlicht, das ebenfalls Apoptose-modifizierte Proteine in Fas-induzierten Jurkat T-Zellen zum Inhalt hatte (Gerner et al., 2000). Die Autoren identifizierten 57 modifizierte Proteine, die wir zum großen Teil ebenfalls gefunden hatten. Interessanterweise identifizierten diese Autoren auch etliche Proteine, die infolge von Streß in der Zelle hochreguliert werden. Diese unspezifische Streßantwort wurde in unserem Screen durch die gewählte Versuchsanordnung erfolgreich vermieden.

Zitierte Literatur:

- Brockstedt,E., Otto,A., Rickers,A., Bommert,K., and Wittman-Liebold,B. (1999). Preparative high-resolution two-dimensional electrophoresis enables the identification of RNA polymerase B transcription factor 3 as an apoptosis-associated protein in the human BL60-2 Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* 18, 225-231.
- Gerner,C., Frohwein,U., Gotzmann,J., Bayer,E., Gelbmann,D., Bursch,W., and Schulte-Hermann,R. (2000). The Fas-induced apoptosis analyzed by high throughput proteome analysis. *J. Biol. Chem.* 275, 39018-39026.
- Klose,J. and Kobalz,U. (1995). Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-1059.
- Otto,A., Muller,E.C., Brockstedt,E., Schumann,M., Rickers,A., Bommert,K., and Wittmann-Liebold,B. (1998). High performance two dimensional gel electrophoresis and nanoelectrospray mass spectrometry as powerful tool to study apoptosis- associated processes in a Burkitt lymphoma cell line. *J. Protein Chem.* 17, 564-565.
- Thiede,B., Dimmler,C., Siejak,F., and Rudel,T. (2001). Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis. *J. Biol. Chem.* 276, 26044-26050.
- Thiede,B., Lamer,S., Mattow,J., Siejak,F., Dimmler,C., Rudel,T., and Jungblut,P.R. (2000). Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 14, 496-502.

Thiede,B., Siejak,F., Dimmler,C., Jungblut,P., and Rudel,T. (2000). A two-dimensional electrophoresis database of a human Jurkat T cell line. *Electrophoresis* 21, 2713-2720.

4. Erfolgte und geplante Veröffentlichungen

Projekt im Internet: <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE/>

Publikationen:

Thiede, B., Siejak, F., Dimmler, C. and Rudel, T., Prediction of translocation and cleavage of hnRNPs and Rho GDI 2 during apoptosis by subcellular proteome analysis, *Proteomics*, in press

Thiede, B., Dimmler, C., Siejak, F. and Rudel, T., Predominant identification of RNA-binding proteins in Fas-induced apoptosis by proteome analysis, *J. Biol. Chem.*, 276, 26044-26050, 2001

Thiede, B., Siejak, F., Dimmler, C., Jungblut, P.R., and Rudel, T., A two dimensional database of a human Jurkat T-cell line. *Electrophoresis*, 21, 2713-2720, 2000

Thiede, B., Lamer, S., Mattow, J., Siejak, F., Dimmler, C., Rudel, T., and Jungblut, P.R. Analysis of missed cleavage sites, tryptophan oxidation and N-terminal pyroglutamylation after in-gel tryptic digestion. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 14, 496-502, 2000.

III. Erfolgskontrollbericht

1. Beitrag der Ergebnisse zu den förderpolitischen Zielen

Mit der Förderung von Vorhaben der Biotechnologie strebt das BMBF die Kommerzialisierung der Biotechnologie an. Die im Projekt 312260 erzielten Ergebnisse wurden bereits im Jahr 2000 zum Patent angemeldet und sollen in der eigens dafür gegründeten Firma MediTarget GmbH vermarktet werden. Dank der Förderung durch das BMBF konnte die Technologie und das Team für die Firmenausgründung etabliert werden.

2. Wissenschaftlich-technische Ergebnisse, Nebenergebnisse und gesammelte wesentliche Erfahrungen

Ein wesentliches wissenschaftliches Ergebniss dieses Projektes ist die Identifizierung von 104 Apoptosetargets. Literaturrecherchen ergaben, dass 78 dieser Targets noch nicht in Verbindung mit Apoptose veröffentlicht wurden. Allein schon die große Zahl neuer Apoptosetargets zeigt eindrücklich, dass die Prognose von 20 neuen Targets bei weitem übertroffen wurde, die Strategie des Vorhabens also richtig war. Dank einer eigens dafür entwickelten Klonierungsstrategie konnten 39 statt der 10 geplanten Targets kloniert werden. Mit Hilfe von *in vitro* exprimierten Targets gelang bei 23 der Nachweis einer Modifikation durch Caspasen. Für zwei der neuen Targets wurden noch während des Förderzeitraums detaillierte molekularbiologische Studien begonnen. Für zwei der Targets wurden Antikörper bzw. single chain Antikörper (scFv) über *phage display* zur einfacheren Detektion im Immunoblot generiert.

Eine wesentliche Erfahrung aus dem abgeschlossenen Projekt war, dass die Sensitivität der Targetidentifizierung wesentlich durch die Fraktionierung der Zellen in leichte und schwere Membranfraktionen, Kerne und Zytosol gesteigert werden kann. Diese Arbeiten waren ohnehin geplant, um die Translokation von Targets zwischen den Kompartimenten während der Apoptose zu detektieren. Eine weitere, eher negative Erfahrung betraf die Identifizierung von Targets, die während der Apoptose phosphoryliert oder dephosphoryliert werden. Diese sind im komplexen Gemisch zwar zu detektieren, können jedoch nicht einfach identifiziert werden. Aus diesem Grunde wurde im Rahmen der BMBF-Ausschreibung „Neue effiziente Verfahren für die funktionelle Proteomanalyse“ im Rahmen des Verbundprojektes „Neue Methoden

zur Erfassung des Gesamtproteoms von Bakterien“ ein Antrag zur Finanzierung eines Entwicklungsprojektes gestellt, das diese Problematik lösen soll.

Fortschreiben des Verwertungsplanes

Das primäre Ziel des Vorhabens war die Gründung einer Firma zur Verwertung der in der Vorphase gewonnenen Ergebnisse. Um dieses Ziel zu erreichen, wurden die erzielten Ergebnisse in der Patentanmeldung 'Method for identifying apoptosis-modified proteins', WO 01/96873 A2, geschützt.

Ein weiterer entscheidender Schritt war die Gründung der Firma MediTarget GmbH am 1. März 2001. Zur Zeit wird intensiv nach Investoren für die MediTarget GmbH gesucht, um die Firma aus dem MPI auszugründen und in die operative Phase eintreten zu können. Das Patent WO 01/96873 A2 sowie das Patent 'New proteins with antitumor activity from *Aplysia punctata*' WO 02/31144 A2, das ebenfalls in der Vorphase der Firmengründung erarbeitet und angemeldet wurde, können von MediTarget GmbH exklusiv einlizenzieren werden. Ein entsprechender Lizenzvertrag wurde mit der Garching Innovation, der Verwertungsfirma der MPG, bereits ausgehandelt.

Wissenschaftlich interessante Ergebnisse wurden in nunmehr 4 Publikationen veröffentlicht. Bis die MediTarget GmbH operativ tätig werden kann, wird ein Teil der Projekte am MPI für Infektionsbiologie in der AG Rudel weitergeführt. Einige der im Rahmen des Projektes 312260 identifizierten interessanten Targets sollen mit Hilfe molekularbiologischer Methoden untersucht und die Ergebnisse in Fachzeitschriften publiziert werden.

Von besonderem wissenschaftlichem Interesse sind auch die 2-DE Muster apoptotischer Zellen, die während des Projektes erstellt wurden. Diese Daten dienen jetzt als Basis für Projekte, die die Erfassung von Musterveränderungen nach Stimulierung der Apoptose mit unterschiedlichen Induktoren und in verschiedenen Zelllinien zum Ziel haben.

3. Arbeiten, die zu keinen Ergebnissen geführt haben

Es wurden keine bedeutenden Arbeiten durchgeführt, die zu keinem Ergebnis geführt haben.

4. Präsentationsmöglichkeiten

Die hier erzielten Ergebnisse eignen sich nicht, auf Anwenderkonferenzen vorgestellt zu werden. Die wesentlichen, bereits patentierten Ergebnisse wurden in Fachzeitschriften veröffentlicht.

5. Einhaltung der Ausgaben- und Zeitplanung

Die im Antrag definierten Meilensteine konnten zeitlich eingehalten, in den meisten Fällen sogar übertroffen werden. Die eingeplanten Mittel reichten für die Durchführung des Vorhabens aus.